

MANUFACTURE OF LIPOSOME SOLUTION OR SUSPENSION IN AQUEOUS MEDIUM

Patent number: JP54041279
Publication date: 1979-04-02
Inventor: MIHIERU SHIYUNADAA
Applicant: BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE
Classification:
- international: **A61K9/127; A61K9/127; (IPC1-7): B01J13/02**
- european: **A61K9/127P**
Application number: JP19780093729 19780802
Priority number(s): CH19770009616 19770805

Also published as:

 US4224179 (A1)
SU1158031 (A1)
NL7808167 (A)
LU80071 (A)
GB2001929 (A)

Abstract of corresponding document: **US4224179**

A process for the preparation of a solution or suspension of liposomes in an aqueous medium comprising the steps of dispersing a first aqueous liquid in an essentially water-insoluble solvent in the presence of a compound of the formula XY wherein X is a hydrophilic lipophobic group and Y is a lipophilic hydrophobic group to form a dispersion of liposome precursors in the solvent, the precursors consisting of small vesicles of the first aqueous liquid surrounded by a monomolecular film of compound XY, emulsifying the liposome precursors in a second aqueous medium in the presence of a compound of the formula ZW wherein Z is a hydrophilic group and W is a hydrophobic group to thereby form a solution or suspension of liposomes in the second aqueous medium, said liposomes consisting of the first aqueous liquid surrounded by a bimolecular film of the structure XY-WZ and removing the water-insoluble solvent prior to after said emulsification.

BEST AVAILABLE COPY

⑨日本国特許庁(JP)

⑪特許出願公開

⑫公開特許公報(A)

昭54—41279

⑬Int. Cl.²
B 01 J 13/02

識別記号 ⑭日本分類
13(7) D 32

⑮庁内整理番号 ⑯公開 昭和54年(1979)4月2日
6639—4G

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 10 頁)

⑰水性媒体中のリポソームの溶液または懸濁液
の製法

⑱特 願 昭53—93729

⑲出 願 昭53(1978)8月2日

優先権主張 ⑳1977年8月5日㉑スイス(C
H)㉒9616/77

㉓発 明 者 ミヒエル・シュナイダー
スイス国1212ジュネーヴ・グラ

ンドーランシー・アヴェニユ・
デ・コモン・ロイニー58

㉔出 願 人 バテル・メモリアル・インステ
イチュト

アメリカ合衆国オハイオ・コロ
ンブス・キング・アヴェニユ50
5

㉕代 理 人 弁理士 青木朗 外3名

明 細 書

1. 発明の名称

水性媒体中のリポソームの溶液または懸濁
液の製法

2. 特許請求の範囲

1. 式XY(式中、Xは親水性かつ疎油性の基
を示し、Yは親油性かつ疎水性の基を示す)の表
面活性剤または脂質の存在において第1の水相を
水不溶性溶剤中に分散させて、前記式XYの化合
物で前記第1の水相をカプセル化した小胞からな
るリポソームプリカーサを得、このリポソームプ
リカーサを第2の水性媒体と接触させて、この水
性媒体中のリポソーム溶液または懸濁液を生成す
る製法であつて、前記式XYの化合物または式ZW
(式中、Zは親水性基を示し、Wは疎水性基を示
す)の他の界面活性剤を過剰に存在させて前記リ
ポソームプリカーサを前記第2の水性媒体中に分
散させて乳化させ、この乳化の前または後に前記
水不溶性溶剤を除去する、水性媒体中のリポソ
ームの溶液または懸濁液の製法。

2. 前記水不溶性溶剤中に前記第1の水相を分
散させることを音波または超音波の振動によつて
行なう、特許請求の範囲第1項記載の水性媒体中
のリポソームの溶液または懸濁液の製法。

3. 前記水不溶性溶剤の除去を、リポソームプ
リカーサを前記第2の水性媒体中で乳化した後
に得られた乳濁液を蒸発状態として行なう、特許請
求の範囲第1項記載の水性媒体中のリポソーム溶
液または懸濁液の製法。

4. 式XY(式中、Xは親水性かつ疎油性の基
を示し、Yは疎水性かつ親油性の基を示す)の表
面活性剤または脂質を過剰に溶解している水不溶
性または水難溶性の溶剤中に、カプセル化すべき
製品を溶解して含む第1の水相を音波または超音
波の振動によつて分散させて、前記基Xおよび基
Yがそれぞれ小胞すなわちビーズ(以後リポソ
ームプリカーサと呼ぶ)の内方および外方を指向し
ている式XYの表面活性剤または脂質からなる膜
を壁として前記カプセル化すべき液体を囲んで含
むリポソームプリカーサを前記溶剤中に溶解また

は懸濁させ、過剰の脂質を含むリボソームプリカーサの溶液または懸濁液を得、このリボソームプリカーサの溶液または懸濁液を第2の水性媒体と接触させて、この水性媒体中のリボソームの溶液または懸濁液を生成する製法であつて、前記第2の水性媒体と前記リボソームプリカーサの溶液または懸濁液とを相互に乳化させて、この水性媒体中のリボソームの乳濁液を得、この乳濁液を蒸発状態としてすべての揮発性溶剤を蒸発させる、溶剤を含まない水性媒体中のリボソームの溶液または懸濁液の製法。

5. 脂質として、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチン、リソホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、カルジオリビン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ステアシルアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリンから選択された1つの化合物を使用する、特許請求の範囲第1項記載の水性媒体中のリボソーム溶液または懸濁液の製法。

法。

9. 水性分散媒体として、純水または水溶性塩類の水溶液たとえば0.15 M/l NaCl溶液を使用する、特許請求の範囲第1項記載の水性媒体中のリボソームの溶液または懸濁液の製法。

10. 前記蒸発状態とするには、液体の上に気流を通して掃引するかまたは減圧とするかして行なり、特許請求の範囲第4項記載の水性媒体中のリボソームの溶液または懸濁液の製法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は水性媒体中のリボソームの溶液または懸濁液の製法に関する。

リボソームは一般に球形をなす顕微鏡的な小胞であつて、単層または同心の複数層のラメラをなす脂質分子、すなわち疎油性かつ親水性の基と親油性かつ疎水性の基とを有する化合物からなる。水溶性リボソームラメラは少なくとも1つの二分子性脂質層（以後脂質を式XYで表わし、式中、Xは親水性基を示し、Yは疎水性基を示す）からなり、この層の分子はその親水性基が水相と接すること

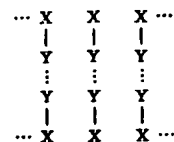
6. 式XYおよび/または式ZWの化合物として、

少なくとも1つのりん脂質と、少なくとも1つのりん脂質以外の種類に属する他の脂質、たとえばコレステロールおよびトコフェロールから選択された化合物との混合物を使用する、特許請求の範囲第1項記載の水性媒体中のリボソームの溶液または懸濁液の製法。

7. 水不溶性溶剤として、ベンゼン、アルキルおよびヘロアルキルベンゼン、脂脂肪酸のエーテル、アルデヒド、エステルおよびケトン、遊離およびヘロゲン化の脂脂肪酸および脂環式の炭化水素を使用する、特許請求の範囲第1項記載の水性媒体中のリボソームの溶液または懸濁液の製法。

8. カプセル化すべき製品として、プロセスまたは組成物に導入した時点よりいくらか遅延して作用するかまたは時間の経過にともなつて放出される工業製品、または染料、香料、薬料、薬劑、酵素、ポリペプチド、キレート化剤から選択された製品を使用する、特許請求の範囲第4項記載の水性媒体中のリボソームの溶液または懸濁液の製

く配向する。複数層のリボソームラメラは水膜によつて相互に分離されているので、その膜壁の断面は次に記載する模型のごときXY-YXの構造を重畳させた一連の分子複合体で表わされる。リボソーム小胞の大きさは極めて種々であつて、後述のごとく製法によつて変化するが、一般に直径が25~30,000 nm、小胞の周囲の脂質膜は厚みが約3~10 nmである。この範囲の寸法で比較的小さいリボソームは一般に単層のエンベロップを有し、次のごとく分子複合体の単層からなる。



リボソームが分散している溶液または懸濁液の水性媒体と、リボソームの内側に含まれる水相とは一般に相違する。従つてリボソームの製造は水性液体を囲んで実際にカプセル化する方法であり、この小胞は生物学的活性物質を生体内に導入する

のに実験に有用である。すなわち薬剤が治療すべき特定の器官に達する前に(たとえば胃液または腸液によつて)早期に分解することを防止する。化合物(S)は化合物XY(単独)または他の表面活性剤ZW(式中、ZはXと同族、WはYと同族)とともにリポソーム膜を形成するように選択することによつて、特定の器官液の作用には耐えることができかつ生物学的活性物質を放出すべき器官内に存在する媒体によつてのみ溶解される膜を有するリポソームを有効に形成することができる。従つて一般にリポソームはその内側にカプセル化された製品を溶解して含む水溶液を含み、リポソーム溶液自体を構成させるために、水または他の水相、たとえば等張濃度のNaCl水溶液中にリポソームを溶解または分散させることができる。

留意すべきことには、本発明のリポソーム内容物は医薬および他の生物学的活性化合物に限定されるものではなくて他の水溶性物質であつてもよい。これらの物質としては、染料、香料、香味料もしくは一般に特定の工業プロセスで使用する成

した後、音波振動、すなわち音波または超音波の周波数の振動にかける。

他の方法は式XYの化合物(式中、X、Yは上記の意義である)、たとえば脂質を揮発性溶剤中に溶解し、容器内で溶液を蒸発させて、容器の壁に脂質膜を形成させ、一方カプセル化すべき液体をフラスコに入れ、最後にこれを音波または超音波の振動にかけ、これによつて前記液体の一部を脂質のエンベロブによつて囲んだ小滴に分割する。この処理を長びかせると、より多くのリポソームが単層のラメラ殻となる傾向がある。

上記2つの方法によると、カプセル化すべき液体中にリポソームを懸濁させた溶液を得る。これは一般に最終目的物でない。従つて後にリポソーム小胞を担体液体から分離した後、他の水性媒体に分散させる必要がある。最初の液体担体からリポソームを分離するには、たとえばモレキュラシーブシリカゲルまたはSephadex(ポリマ粉末)上のクロマトグラフィーによるかまたは遠心分離を反覆して行なうが、いずれの方法も長くて経済

分、または添加後いくらか遅延して放出すべき物質、または時間の経過とともに徐々に使用すべき物質を使用することができる。従つてリポソームは薬剤自身のみと考えることは誤りであつて、上記のごとく薬剤またはその他の物質を運搬するものである。

またここでいう「脂質」はもつとも広義に解すべきものであつて、前述の式XYまたは式ZWの定義に属する多くの化合物であれば天然物質であつてもよく、またたとえば医薬、化粧品、繊維、洗剤、食品などの工学で使用する多くの種類の表面活性剤のごとき合成物質であつてもよい。

上記意義のリポソーム溶液の製法はすでにいくつか知られており、D.A. Tyrrell, T.D. Heath, C.M. Colley & B.E. Ryman, *New Aspects of liposomes*, *Biochimica & Biophysica Acta*, 457(1976), 259-302に記載されている。その1つの方法は、カプセル化すべき脂質と水性液体との不均質混合物を室温以上の温度に加熱し、次にこの混合物を激しく攪拌

的でない。

リポソーム溶液の他の製法として、脂質のエタノール溶液をカプセル化すべき溶液に注入して約25 nmのリポソーム小胞を形成させる。しかしこの方法もカプセル化すべき製品がアルコールの存在で変質しない場合にのみ応用でき、他方得られた小胞をカプセル化されなかつた過剰の液体から分離した後、再び他の水性担体に分散させることは前記製法と同様な欠点である。

また他の方法はカプセル化すべき液体に脂質と洗剤とを混合して乳化した後、透析して洗剤を除去する。この方法においてもカプセル化すべき過剰の液体にリポソームを分散させて、これから分離して精製しなければならない。

さらに留意すべきことには、前記従来の方法はすべて、最終的にリポソーム内にカプセル化すべき量よりもはるかに多量の水性液体を出発物として使用しなければならない。上記のごとくこれらの製法において、溶液またはコロイド状懸濁液中の中空ビーズとして有効にリポソーム中にカプセ

ル化される液体の量対この液体の全量の比は一般に1~10%にすぎない。従つてカプセル化すべき液体が多い場合、すなわち一般に生物学的活性溶液の場合はカプセル化されない液体の部分をさらに循環させる必要がある。さらに望ましくない不純物をこの液体から除去し、かつ活性物質の濃度を回復しなければならない。これは分離・過操作に多量の溶剤を必要とするので、活性物質を受容不可能な程度に希釈するからである。従つてリポソーム溶液の前記製法を工業的規模で行なうことは困難でありかつ費用がかかりすぎる。すなわち収率が比較的低いのに取り扱うべき液体が極めて大量である。

リポソーム水溶液の最近の製法(西ドイツ国公開特許出願 DOS 25 32 317)は上記欠点を著しく改良した。この製法によればカプセル化すべき溶液を、水不溶性有機溶剤中に表面活性剤を溶解した比重が1より小さい溶液に加え、この混合物を従来技術のごとく音波振動にかけると、リポソームプリカーサと呼ぶ顕微鏡的水性小胞が

有機溶剤中に懸濁する懸濁液が得られる。このリポソームプリカーサはカプセル化すべき溶液が有機溶剤中に懸濁して生じ、その小胞は脂質分子の単層によつて囲まれ、この各分子は基 ϕ が水相に接し、すなわち各小滴の内側に向かい、一方基 ψ がその外側に向かつてステルから突出して有機媒体に浸漬し、この有機媒体は過剰の脂質を溶解状態として含む。

その後、プリカーサ懸濁液を、リポソーム溶液を製造するのに好ましい水性媒体の存在下で遠心分離する。この水性媒体は前記有機溶剤よりも密度が高いため、遠心管内で底相となる。遠心分離中にリポソームプリカーサは遠心力によつて上部の有機相から分離して水相に入る。こうしてリポソームプリカーサは有機溶剤-水の界相を通過するが、もちろんこの界相は有機溶剤に過剰の脂質が溶解しているので脂質障壁を有する。この界相中の脂質分子は2つの相の相対的位置に応じて自然に配向する、すなわち基 ϕ は水に浸漬し、基 ψ は溶剤に浸漬する。この障壁を通過するとき

リカーサは表面活性剤の第2層を獲得して、その分子は第1層に対して裏返しの状態となり、こうして2つの層は正常構造XY-YXを有するリポソームラメラを構成する。従つてこの方法は所望の水性媒体中のリポソーム溶液を直接に得る。

換言すればこの最近の方法は2つの段階からなり、第1段階において音波振動によつて小胞すなわちカプセル化すべき液体の小球が他の水不溶性または水難溶性の液体中に分散する(この小球はコロイド状の大きさすなわち20~100 nmである)。この小球は化合物XYの単分子層によつて囲まれ、親水性基Xはカプセル化された液体を含む小球の内側に向かい、疎水性基Yは反対に小球の外側に向かい、外側には非水相がある。この小球は、化合物XYの二分子層によつて囲まれていないので真のリポソームではないが、リポソームの骨格と考えることができる。それは各小球に含まれる水性液体が最終的に形成されるリポソームに含まれる水性液体と同一種類であるからである。従つてこの小球をリポソームプリカーサと呼ぶことは正当である。

カプセル化すべき水性液体と、有機溶剤と、化合物XYとの比を適当に調節することによつて、リポソームプリカーサ内に最小の水性液体のほとんど全量をカプセル化することができる。完全な方法の収率はしばしば理論収率に近く、たとえば約80%であり、古典的方法の収率が1~20%であるのに比べて著しく改良された。

この方法の第2段階はリポソーム自身を形成する工程からなる。理論的に化合物XYの単分子層のプリカーサが非水性の上層と水性の下層との間の界面を横切ることによつてリポソームが形成される。留意すべきことには、このような単分子小胞の存在はそれ自身知られており、それは表面活性剤XYは親水性基Xが水に吸引されるが、親油性基Yは有機物相と接触したままであることから本質的に生ずるのである。従つて各プリカーサは境界層を横切つて移動するとき、この薄膜の一部を同伴してプリカーサの周囲の第1の単分子膜と結合し、リポソーム特有の頭部と頭部とを向い合わせた結合の二分子ラメラを形成する。

この方法は前記のごとくリポソーム溶液の古典的な製法を行なうときに必要な、最初の水性液体の活性成分を回収してその濃度を回復する通常な操作を避けることができる。またこの方法によればたとえば0.05～0.1Mのごとき極めて少量の液体をリポソームの形でカプセル化することができることが分かる。この体積はこれより以前の方法によつては十分ではなかつた。こうしてこの最近の方法はリポソーム溶液を直接に製造することができ、まずリポソームを最初の水性液体の残りから分離し、さらにこのリポソームを所望の他の水性媒体に再び分散させる必要がないので、古典的方法が適当でない多くの場合、たとえば生物学および医学的の場合ならびに分析において応用することができる。

しかし注意すべきことには、この最近の方法は優れた利点があるが2つの欠点も有する。第1に水不溶性の有機溶剤は水より軽い（遠沈管内で水が下相になる）必要があるので溶剤の選択に特定の制限がある。第2に遠心分離操作自体が望まし

くない、すなわち通常の高速度遠心分離は1回の操作で大量の液体を処理することができない。従つて遠心分離は時間と費用とを要する。さらに超遠心分離における（約 $10^3 \sim 10^5$ gの）大加速度に敏感な生物学的製品の場合にはこれに耐えられないものもある。

本発明はこれらの欠点を完全に解消するものである。すなわち本発明の方法は前記従来技術のごとく、リポソームプリカーサを形成し、このプリカーサを第2の水性媒体と接触させて、この水性媒体中におけるリポソームの溶液または懸濁液を生成するものであり、前記リポソームプリカーサは第1の水相が式XY（式中、Xは親水性かつ疎油性の基を示し、Yは親油性かつ疎水性の基を示す）の表面活性剤または脂質のエンベロップによつて囲まれた小胞からなり、前記リポソームプリカーサは化合物XYの存在において第1の水相を水不溶性または水難溶性の溶剤中に分散させて生成する。本発明の方法はリポソームプリカーサを第2の水性媒体中に乳化させるがこのとき過剰な化

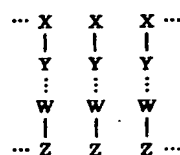
合物XYまたは他の表面活性剤ZW（式中、Zは親水性基を示し、Wは疎水性基を示す）の存在において行ない、前記水不溶性または水難溶性の溶剤は前記乳化の前または後に除去する。

第1の水性相を水不溶性溶剤に分散させるためには音波振動、激しい攪拌、ホモジナイザ、ガス吹込み、噴霧などのごとき古典的な方法を使用できる。このうちで音波振動が便宜である。乳化の前に水難溶性溶剤を分離するときは蒸留、蒸発および遠心分離のごとき古典的方法を使用できる。しかし乳化の前に溶剤を除去することはプリカーサが部分的に凝集するので望ましくない。従つて溶剤を含むプリカーサを第2の水性媒体中に乳化させた後に前記のごとく溶剤を分離することが好ましい。この分離はたとえば選択的な蒸留または蒸発によつて行なうことができる。好ましい方法は2つの相を相互に乳化させ、この乳濁液を蒸発状態として非水性溶剤を蒸発させ、これによつて溶剤を含まない、前記水性媒体中のリポソームの溶液または懸濁液を製造する。

本発明の実施態様の操作を実施するために、反応器内に水不溶性有機溶剤を入れ、脂質または脂質分を構成する式XYを有する化合物の混合物を加え、次にカプセル化すべき水性溶液を加え、得られた混合物をホモジナイズし、音波または超音波の振動にかけて、水性液体を囲むリポソームプリカーサと呼ぶ小胞すなわちビーズを形成する。次に所望量の第2の水性媒体、たとえば1種または数種の塩類を溶解した希薄水溶液、または簡単に純水を加え、必要であれば上記定数の化合物XYまたは他の化合物ZWをさらに加え、得られた混合物を乳化攪拌機によつて均質な乳濁液を形成する。この乳濁液は水相中に溶剤が微細な小滴として分散し、この溶剤の各小滴は過剰の脂質分を溶解して含み、かつ種々の数のリポソームプリカーサを懸濁させて含む。次にこの乳濁液を攪拌して、（また乳濁液が本質的に安定なときは攪拌機を止めた後も）安定な乳濁状態を保ちながら、反応器の内容物を蒸発状態とする。たとえば室温において液体の表面に（またはこれに正接して）、

空気（または他のガス）を吹きつけ、空気に溶剤の蒸気を負荷させ、この空気を凝縮器に通して、低温度に冷却して蒸気を凝縮させる。

蒸発につれて溶剤の小滴は大きさが小さくなるので、リポソームプリカーサは溶剤の小滴から次第に追い出され、溶剤-水の界面膜を通つて相を分離する脂質膜を通つて分散し、プリカーサ膜をさらに脂質で被つてプリカーサ状態から真のリポソーム状態となる。従つて得られる、水性媒体中のリポソームの溶液または懸濁液は、前記のごとく加えた第2の水性媒体中に溶解または分散した状態の小胞を含む。この方法の最後の段階において式XYとは異なる式ZWの表面活性剤または脂質を使用することが有利である、特に疎水性かつ親油性の基Yおよび基Zの間の親和力が、2つの基Yの間の親和力または2つの基Zの間の親和力よりも大きいときに有利である。この場合（たとえば式XYの化合物が良好な親油性分散剤でありかつ式ZWの化合物が良好な親水性分散剤である場合）はリポソームの殻が



の構造を有し、このときリポソームは特に安定である。

この方法は収率が（約50～約80%と）極めて高く、従来技術の方法と比較して極めて単純に行なうことができる。大量の物質を一度に加工して、所定であれば水より重い溶剤を使用することもできる。従つてさきのDOS 25 32 317の方法よりも溶剤の選択範囲が広いので、種々な表面活性剤を使用でき、たとえば室温において固体であつて従来の方で使用するときは通常はカプセル化すべき製品にしはしば害を与えるとき温度に加熱して溶融しなければならない種類の脂質も使用できる。さらに溶剤の選択範囲が広いので、カプセル化すべき活性成分に対して不活性な溶剤を見出す必要があるときに溶剤を適当に選択することができる。

さらに注意すべきことには、上記乳濁液を調製するためおよび次に溶剤を蒸発させるために上記以外の他の手段を使用できる。たとえば振盪して乳化させることおよび減圧蒸留させることができる。しかしどの方法によっても溶剤の蒸気分圧は水よりも明かに大きくなければならない。さもないと水がなくなるのを防ぐために、蒸発中に何回も水を補給する必要がある。

溶剤として使用できるものとして、ベンゼン、トルエン、シクロヘキサン、石油エーテルおよびオクタンなどの炭化水素、ジエチル、ジイソプロピルおよびジブチルなどのエーテル、エチル、プロピルまたはブチルの酢酸エステルおよび炭酸エチルなどのエステル、ならびに CCl_4 、 CH_2Cl_2 、クロロホルム、ベンジルククロライドなどの塩素化炭化水素がある。

式XYまたは式ZWの表面活性剤として、たとえば三元脂質すなわち複合脂質、グリセライド、セライド、エストライド、ステライドなどを使用でき、また親水性の基Xまたは基Zとしてホスフ

エート、カルボキシル、サルフェート、アミノ、ヒドロキシルおよびコリンから選択し、疎水性の基Yまたは基Wとして飽和または不飽和の脂肪族炭化水素基（たとえばアルキルまたはアルキレン）、ポリオキシアルキレンおよび少なくとも1個の芳香族基または脂環式基で置換した脂肪族炭化水素基を有する1種または数種の化合物を使用できる。

また留意すべきことには、式XYまたは式ZWの化合物を使用するとき、得られるリポソームは親水性基の種類によつて区分される。すなわちホスフエート、サルフェートのごとく酸性であるときは陰イオン性の(-)リポソームを得、アミノのごとく塩基性であるときは陽イオン性の(+)リポソームを得、ポリエチレンオキシドまたはグリコール基のごとく中性であるときは中性リポソームを得る。本発明の方法の実施に適当な多数の化合物は、Mc Cutcheon's Detergents & Emulsifiers and Mc Cutcheon's Functional Materials, Allured Publ. Company, Ridgewood, N.J., USAに記載されている。式XYまたは式ZWの化合

物として、りん脂質、たとえばレシチン、ホスホチジルエタノールアミン、リソレシチン、リソホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セラプロシド、ジセチルホスフェート、ホスファチジルコリンおよびジパルミトイルホスファチジルコリンを使用することが好ましい。りんを含まない脂質として、たとえばステアリンアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン (Kodak Ltd.)、セチルパルミテート、グリセリルリシノレート、ヘキサデシルステアレート、イソプロピルミリステート、アンホテリクアクリクポリマ、トリエタノールアミン-ラウリルサルフェート、アルコイルアリアルサルホネート、ポリエトキシレート化された脂肪酸アミドなどを使用できる。さらに脂質分はリポソーム膜の安定性および透過性を制御するための他の物質を溶解して含むことができる。この物質として、ステロール、たとえばコレステロール、トコフェロール、

フィトステロールおよびラノリン抽出物などがある。

本発明の方法において、リポソーム製の化合物に対して親和力の弱く、またこの殻を浸透するときすべての水溶性物質をカプセル化することができる。この点から、すでに記載した化合物の他に、重金属キレート化剤、酵素、薬剤、抗生物質などのごとき生物学的活性物質の水溶液を使用することができる。適当な物質の例は、G. Gregori-dias, Targetting of Drugs, Nature 265, [2] (1967), 407に記載がある。

リポソームを最終的に分散溶解する第2の水性媒体としては、純水または他の通常的水性液体を使用できる。リポソームの最終分散媒体とする液体はたとえば希薄NaCl溶液を使用することが好ましい。特に体内に直接注入できる媒体中のリポソーム溶液または懸濁液を直接得るために、本発明の方法の第2段階において、生理的食塩水といわれる0.15 M/l (0.9重量%) NaCl水溶液を使用できる。本発明の方法の他の利点は、リポソ

ームの最終使用に応じて選択したリポソーム懸濁液を直接得ることである。もちろん、たとえばカプセル化されずに水性媒体中に溶解した活性化合物のすべての痕跡をなくすることを望む場合は、本発明の方法によつてリポソームを分散させる水性媒体から製造したリポソームを常に分離できる。そしてたとえばSephadexによるクロマトグラフィーのごとき通常的手段によつて分離できる。

次に実施例によつて本発明をさらに詳細に説明する。

実施例 1

10 mlのバイレットスフラスコにジパチルエーテル2 mlとシクロヘキサノン1 mlと、次にpH 3 (HCl N/10)の0.9% NaCl水溶液に溶解した10 mg/lインシュリン溶液0.2 mlとを加えた。次にジパルミトイルホスファチジルコリン(親水性かつ親油性化合物)150 mgを加えて得られた不均質混合物にBRANSON“発振器(Model B-12, 20 kHz, 150 W)によつて超音波振動を1 minかけた。得られた透明溶液は、インシュリン

溶液の微小胞の形のリポソームプリカーサを含み、その膜壁は表面活性剤層からなり、この分子の配向は、親水性基(ホスファチジルコリン)が小胞の内側に向かい、疎水性基(炭化水素鎖)は外側の有機溶剤に向かう。この微小胞は界面活性剤を過剰に溶解した有機溶剤中にコロイド状として懸濁していた。

次に0.9% NaCl中性溶液30 mlを入れた他のフラスコにこの有機溶剤を入れ、高速度で回転する乳化攪拌機によつて30℃で乳化した。この工程の後に混合物は水性媒体中の有機溶剤の小滴となつて懸濁していた。上記のごとく各小滴はリポソームプリカーサを懸濁しかつ過剰の脂質を含む。

適当な管を通してフラスコに空気流を送り、30℃で攪拌しながら懸濁液に接してその液面を掃引した。空気と溶剤蒸気との混合物を凝縮器で-10℃に冷却して蒸気を液化した。この操作は凝縮が終了するまで(約20~約30 min)継続した。

この工程の後にフラスコに残る0.9% NaCl透明溶液はリポソームカプセルが小胞の形として懸

濁し、その殻は表面活性剤の二分子層からなり、その分子の配向は頭部と頭部とを向い合わせ、その尾部は殻の膜壁の内側と外側とに向かう。この殻の外側層は有機溶剤中に脂質を過剰に溶解して蒸発することによつて得られた。このリポソーム溶液 2 ml を、Sephadex G-50 2.5 g を入れたカラム（溶離剤：0.15 M/L NaCl 水溶液 + 0.05 M/L りん酸塩緩衝剤、pH 7.5）によつてクロマトグラフィーにかけ、溶出液を分光分析した結果、最初のインシュリン溶液のうち僅か 20～25% がカプセル化されずに溶液に逃げたことが分かった。従つて多くの場合にこの実施例によつて得られたリポソーム溶液はさらに精製することなく治療用として使用することができる。

実施例 2

10 g/L アミログルコシダーゼ水溶液をカプセル化して 0.15 M/L NaCl 溶液に分散させた。すなわち、レシチン 7.4 mg と、アミログルコシダーゼ溶液 0.1 ml と、ジイソプロピルエーテル 3 ml とを、水浴で 30℃ 以下に冷却しながら、20 kHz、

150 W で 2 min 音波振動にかけた。得られた透明な青色の均質液体に 0.15 M/L NaCl 水溶液 15 ml を加えた。この混合物を実施例 1 に記載するごとく乳化した後、微細粒子を含む乳濁液を窒素気流で掃引して有機溶剤を蒸発させた。この吹きつけは蒸発が終了するまで（20～30 min）継続した。コロイド状リポソームが 0.15 M/L NaCl 水溶液に懸濁した透明な懸濁液が得られ、リポソームにはアミログルコシダーゼ水溶液がカプセル化され、極めて少量（約 5%）のカプセル化されなかつた酵素が NaCl 水溶液に含まれた。

所望の用途に応じて、この溶液はそのままで使用するか、またはカプセル化されなかつたアミログルコシダーゼを（たとえば Sepharose 上のゲルクロマトグラフィーによつて）分離した後に使用する。

実施例 3

カプセル化すべき溶液は 0.5 mg/ml アラビノースシトシンの緩衝水溶液（りん酸塩緩衝剤 10 mM/L、pH 7.2）0.05 ml、分散相は 0.15 M/L NaCl 水溶

液 10 ml、脂質はカルジオリピン（4.7 mg）、有機溶剤はジブチルエーテル（2.4 ml）および CHCl_3 （0.6 ml）を使用したことの他は実施例 1 と同様に行なつた。

実施例 4

カプセル化すべき溶液は 100 mg/ml ペニシリン（0.1 ml）、分散媒体は 0.15 M/L NaCl 水溶液、表面活性剤はレシチン（105 mg）およびコレステロール（35 mg）、溶剤はブチルアセテート（3 ml）を使用したことの他は実施例 1 と同様に行なつた。

実施例 5

カプセル化すべき溶液は 150 mg/L ベータメタゾーンのりん酸二ナトリウム塩水溶液（0.05 ml）、分散相は 0.15 M/L NaCl 水溶液、脂質はレシチン（85 mg）およびホスファチジルエタノールアミン（45 mg）、溶剤は 3-ヘプタノン（3 ml）を使用したことの他は実施例 1 と同様に行なつた。

実施例 6

カプセル化すべき溶液は 1 mg/ml ポリイノシン酸

-ポリシチジル酸（ポリ(I)-ポリ(C)）の酸性複合体（0.05 ml）、分散相は 0.15 M/L NaCl 水溶液、表面活性剤はレシチン（60 mg）、ステアリルアミン（20 mg）およびコレステロール（15 mg）、溶剤はジイソプロピルエーテルおよびブチルアセテートの容積比 1:1 混合物（3 ml）を使用したことの他は実施例 1 と同様に行なつた。

実施例 7

ジイソプロピルエーテル 20 ml にレシチン 1.5 g、ホスホチジルセリン 0.4 g およびコレステロール 0.5 g を加え、次にアクチノマイシンド 18 mg/ml りん酸塩緩衝剤（0.1 M/L、pH 7）3 ml 中に溶解した溶液を加えた。この混合物を実施例 1 のごとく 5 min 音波振動にかけた。次にりん酸塩水溶液（0.1 M/L、pH 7）100 ml を加えて実施例 1 と同様に乳化した。乳化攪拌機を停止させずに、フラスコを真空ポンプに連結し、温度を 20～22℃ に制御しながら、徐々に 10 Torr に減圧した。約 45 min 後ジイソプロピルエーテルを完全に除去し、残留混合物として透明なリポソーム溶液を

得た。試料を Sephadex 上でクロマトグラフィー分析した結果、最初のアクチノマイシン D の 88 % がカプセル化されたことが分かった。

実施例 8

0.1 M/L (pH 7) リン酸塩緩衝剤 30 ml 中のトリプシン 1 g を、ジプロピルエーテル 100 ml 中のホスファチジルイノシトール 30 g の溶液の存在下で音波振動にかけた。次に 0.5 % NaCl 水溶液 460 ml を加えて乳化させた。微細な粒子を含む乳濁液を 10 Torr, 15°C において 3 h 蒸発させた結果透明なリポソーム溶液を得た。試料を (Sephadex G-50 上でクロマトグラフィー) 分析し、カプセル化収率が約 85 % であることを確めた。

実施例 9

この実施例において無対称性エンベロップを有するリポソームの製法を記載する。このエンベロップは内側層がジパルミトイル-ホスファチジルコリン、外側層が卵レシチンおよびホスファチジルセリンの混合物からなる。

ンおよびホスファチジルセリンの混合物からなり、内側層はジパルミトイルホスファチジルコリンであつた。

実施例 10

インシュリンを含むリポソームプリカーサを実施例 1 のごとく生成した。次に実施例 1 において続いて記載する方法、すなわち微小胞を含む 0.9 % NaCl 水溶液で直接乳化する代わりに、まず有機溶液を室温で減圧 (20 Torr) 濃縮した。有機溶剤を蒸発した後、容器の底に微小胞が凝集した半透明な油状層を得た。フラスコに 0.9 % NaCl 水溶液 7 ml を加え、磁気攪拌機によつてさきの油相を水性媒体中に分散させた。この油相は徐々に消失して、10~15 min 後に所望のリポソームを懸濁させた透明な均質溶液を得た。この溶液を Sephadex 4 B (Pharmacia, Sweden) 上でクロマトグラフィーにかけ、カプセル化されなかつた相を分析し、出発インシュリンの 52 % が有効にリポソームにカプセル化されたことが分かった。

特開 昭 54-41279(9)

ジブチルエーテル 3 ml に、ジパルミトイルホスファチジルコリン 55 mg、および 3, 9-ビスジメチルアミノフェナゾチオニウムクロライド 0001 M/L, NaCl 0.015 M/L の水溶液 0.1 ml を加えた。次にこの混合物を実施例 1 と同様に音波振動にかけた。得られた透明な有機溶液は上記有色水溶液をジパルミトイルホスファチジルコリン層で固んだ微小胞 (リポソームプリカーサ) を含む。次にこの有機溶液を 8000 g で 20 min 遠心分離した。透明な上澄相と、遠心力によつて相互に凝集した微小胞を含む半透明な青色の底相とを得た。この相は固いゲル状であり、10 ml の容器に移し、卵レシチンおよびホスファチジルセリンのモル比 20:1 の混合物 200 mg/L のジブチルエーテル溶液 0.3 ml とへらで混合し、次にこのゴム状の物質に 0.15 M/L NaCl 水溶液 5 ml を加えて磁気攪拌機によつて激しく攪拌した。さきの物質は徐々に分散し、10~15 min 後に透明な均質溶液を得た。この溶液は混合エンベロップを有するリポソームを含み、エンベロップの外側層は卵レシチ

実施例 11

10 g/L インシュリンを含む 0.9 % NaCl 水溶液 400 ml と、レシチン 40 g と、ジブチルエーテル 600 ml との混合物を Mims Sonic ホモジナイザ (Ultrasonics Ltd, UK) によつてホモジナイズした。得られた安定な乳状溶液を、0.9 % NaCl 水溶液 2 l を入れた 4 l のフラスコに入れて、有機懸濁液と水性媒体とを乳化攪拌機によつて 15 min 攪拌して相互に乳化させた。その後有機溶剤を空気ストリップングによつて除去した、すなわちカラムの上方から混合物を流下させ、これに対向して空気流を上昇させた。空気流は溶剤の蒸気を負荷しているのでカラムの頂部で捕集し、一方インシュリンを含むリポソームの半透明な均質溶液を得た。

実施例 12

ジブチルエーテル 3 ml と、10 mg/ml インシュリンを含む 0.9 % NaCl 水溶液 1 ml と、レシチン 125 mg とを直径 1 mm のガラス玉とともに 10 ml の強力パイレックス管に入れた。この管を封じて振とう

手続補正書(自発)

昭和53年10月16日

特許庁長官 熊谷 善二 殿

器に取りつけ、30 min 毎分100回振とうした。
かなり均質な乳状溶液を得、これを0.9% NaCl
水溶液30 mlを入れた100 mlのフラスコに入れ、
窒素気流を使用して実施例2のごとく、有機溶剤
を蒸発させた。20~30 min 掃引した後、イン
シュリンをカプセル化したリポソームを含む脂質
溶液を得た。

特許出願人

パテル メモリアル インスティテュート

特許出願代理人

弁理士 青 木 朗
弁理士 西 館 和 之
弁理士 寺 田 豊
弁理士 山 口 昭 之

1. 事件の表示

昭和53年 特許願 第093,729号

2. 発明の名称

水性媒体中のリポソームの溶液または懸濁液の製法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 パテル メモリアル インスティテュート

4. 代 理 人

住 所 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル
〒105 電話(504)0721

氏 名 弁理士(6579) 青 木 朗



(外 3 名)

持許庁

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

明細書第12頁第6行目、「ステル」を「殻」
と訂正する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.